

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

|   |  |  |  |
|---|--|--|--|
| (51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :<br><b>G01N 30/58, B01D 15/02</b>  |  | A1   | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/28740</b>              |
|   |  |  | (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>10. Juni 1999 (10.06.99)</b> |
| (21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/AT98/00290</b>  |  | (81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). |  |
| (22) Internationales Anmeldedatum: <b>30. November 1998 (30.11.98)</b>  |  |  |  |
| (30) Prioritätsdaten:<br>A 2030/97 1. Dezember 1997 (01.12.97) AT   |  |  |  |
| (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten außer US): PRIOR SEPARATION TECHNOLOGY GMBH [AT/AT]; Vorarlberger Wirtschaftspark, A-6840 Götzing (AT).  |  | Veröffentlicht<br><i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>  |  |
| (72) Erfinder; und<br>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PRIOR, Adalbert [AT/AT]; Neuburgstrasse 8, A-6841 Götzing (AT).  |  |  |  |
| (73) Anwälte: COLLIN, Hans usw.; Mariahilferstrasse 50, A-1070 Wien (AT).   |  |  |  |
| (54) Title: ANNULAR CHROMATOGRAPH   |  |  |  |
| (54) Bezeichnung: ANNULARCHROMATOGRAPH  |  |  |  |
| (57) Abstract   |  |  |  |
| <p>The present invention relates to an annular chromatograph comprising a coating in the shape of a particulate bed, wherein said chromatograph is characterised in that the particulate bed comprises at least two superimposed areas which contain different materials and which are separated from each other by at least one separation layer.</p>          |  |  |  |
| (57) Zusammenfassung  |  |  |  |
| <p>Gegenstand der Erfindung ist ein Annularchromatograph mit einer Beschickung in Form eines Teilchenbetts, welcher dadurch gekennzeichnet ist, daß Teilchenbett zumindest zwei übereinander angeordnete Zonen aufweist, die unterschiedliches Bettmaterial enthalten und vorzugsweise durch jeweils zumindest eine Trennschicht voneinander getrennt sind.</p> |  |  |  |
| <p>Glas porös (nicht hydrophobiert)</p>   |  |  |  |

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

|    |                              |    |                                   |    |   |    |                                |
|----|------------------------------|----|-----------------------------------|----|---|----|--------------------------------|
| AL | Albanien                     | ES | Spanien                           | LS | Lesotho   | SI | Slowenien                      |
| AM | Armenien                     | FI | Finnland                          | LT | Litauen   | SK | Slowakei                       |
| AT | Österreich                   | FR | Frankreich                        | LU | Luxemburg                                       | SN | Senegal                        |
| AU | Australien                   | GA | Gabun                             | LV | Lettland  | SZ | Swasiland                      |
| AZ | Aserbaidschan                | GB | Vereinigtes Königreich            | MC | Monaco  | TD | Tschad                         |
| BA | Bosnien-Herzegowina          | GE | Georgien                          | MD | Republik Moldau                                 | TG | Togo                           |
| BB | Barbados                     | GH | Ghana                             | MG | Madagaskar                                      | TJ | Tadschikistan                  |
| BE | Belgien                      | GN | Guinea                            | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan                   |
| BF | Burkina Faso                 | GR | Griechenland                      | ML | Mali  | TR | Türkei                         |
| BG | Bulgarien                    | HU | Ungarn                            | MN | Mongolei  | TT | Trinidad und Tobago            |
| BJ | Benin                        | IE | Irland                            | MR | Mauretanien                                     | UA | Ukraine                        |
| BR | Brasilien                    | IL | Israel                            | MW | Malawi  | UG | Uganda                         |
| BY | Belarus                      | IS | Island                            | MX | Mexiko  | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada                       | IT | Italien                           | NE | Niger   | UZ | Usbekistan                     |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan                             | NL | Niederlande                                     | VN | Vietnam                        |
| CG | Kongo                        | KE | Kenia                             | NO | Norwegen  | YU | Jugoslawien                    |
| CH | Schweiz                      | KG | Kirgisistan                       | NZ | Neuseeland                                      | ZW | Zimbabwe                       |
| CI | Côte d'Ivoire                | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | PL | Polen   |    |                                |
| CM | Kamerun                      | KR | Republik Korea                    | PT | Portugal  |    |                                |
| CN | China                        | KZ | Kasachstan                        | RO | Rumänien  |    |                                |
| CU | Kuba                         | LC | St. Lucia                         | RU | Russische Föderation                            |    |                                |
| CZ | Tschechische Republik        | LI | Liechtenstein                     | SD | Sudan   |    |                                |
| DE | Deutschland                  | LK | Sri Lanka                         | SE | Schweden  |    |                                |
| DK | Dänemark                     | LR | Liberia                           | SG | Singapur  |    |                                |
| EE | Estland                      |    |                                   |    |   |    |                                |

## Annularchromatograph

Die vorliegende Erfindung betrifft einen Annularchromatographen mit einer Beschikung in Form eines Teilchenbetts.

Annularchromatographie stellt eine seit einigen Jahren anerkannte und in immer stärker zunehmendem Maße praktizierte Variante präparativer chromatographischer Trennungen dar. Vorzugsweise wird Annularchromatographie eingesetzt, wenn große Mengen an Substanzgemischen aufzutrennen sind, da diese Art der Chromatographie kontinuierlich betrieben werden kann, und das bei relativ hohem Auflösungsgrad.

Eine typische P-CAC-Apparatur ("P-CAC", preparative continuous annular chromatography = präparative kontinuierliche Annularchromatographie) besteht aus einem kreisringförmigem Teilchenbett, das in den Zwischenraum (Ringspalt) zwischen zwei konzentrischen Zylindern gepackt ist. Unter Rotation des Teilchenbetts um seine Achse werden am oberen Ende kontinuierlich Feedlösung sowie ein oder mehrere Eluenten aufgegeben. Derartige Verfahrensweisen sind nach dem Stand der Technik bekannt und weitverbreitet (siehe z.B. EP-A-371.648).

Neben dem Vorteil der großen Durchsatzmengen der Annularchromatographie zeichnet sich diese auch durch hohe Auflösung und Spezifität aus. Dennoch ist es für verschiedene spezifische Trennprobleme erforderlich, weitere Annularchromatographieschritte – beispielsweise unter Verwendung anderer Trenngele als im ersten Schritt – nachzuschalten, um den gewünschten Trennungsgrad zu erzielen. Dies ist einerseits im Vergleich zur herkömmlichen Säulenchromatographie relativ einfach zu bewerkstelligen, da bei annularchromatographischen Trennungen bekannt ist, an welcher Stelle am Kreisumfang das oder die gewünschten Produkte austreten; andererseits sind dafür weitere Annularchromatographen vonnöten, was natürlich den apparativen und damit finanziellen Aufwand stark erhöht.

Ziel der vorliegenden Erfindung ist daher die Bereitstellung einer Vorrichtung zur Annularchromatographie, mittels derer die Auflösung und Spezifität dieses chromatographischen Trennverfahrens effizient gesteigert werden können, ohne den apparativen Aufwand und damit die Verfahrenskosten übermäßig zu erhöhen.

Die Erfindung erreicht dieses Ziel durch einen Annularchromatographen mit einer Beschickung in Form eines Teilchenbetts, der dadurch gekennzeichnet ist, daß das Teilchenbett zumindest zwei übereinander angeordnete Zonen aufweist, die unterschiedliches Bettmaterial enthalten und vorzugsweise durch jeweils zumindest eine Trennschicht voneinander getrennt sind.

Auf diese Weise lassen sich Vor- und Haupttrennschritte oder aber mehrere Trennungen auf unterschiedlicher Grundlage, wie z.B. Ausschluß- oder Affinitäts- und Ionen-austausch-Chromatographie etc., nacheinander innerhalb derselben Trennvorrichtung, kontinuierlich und mit hoher Auflösung und Spezifität durchführen, wobei zusätzlich der Zeit-, Kosten- und apparative Aufwand von Säulenwechsel, einschließlich von z.B. Einengung und Konditionierung des Gemischs für den nächsten Trennschritt, Regenerierung bzw. erneute Äquilibrierung der Säulen, etc., sowie (z.B. bei oxidations- oder feuchtigkeitsempfindlichen Substanzen) die Gefahr von Beeinträchtigungen der Proben bei deren Handhabung minimiert bzw. gänzlich ausgeschaltet werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform kann zumindest eine der Zonen durch Vorsehen von elektrischen Anschlüssen, vorzugsweise in Form von Schleifkontakte, als Elektrophoresezone adaptiert werden, wodurch auch elektrophoretische Trennungen in der oben beschriebenen vorteilhaften Weise durchgeführt werden können. Diese Elektrophoresezone kann vorzugsweise durch jeweils zumindest eine elektrisch nicht-leitende Trennschicht zu der bzw. den übrigen Zone(n) hin begrenzt sein, um die Effizienz der Elektrophorese zu erhöhen.

Das Bettmaterial für die zumindest zwei Zonen kann dabei allgemein aus Anionenaustauschharzen, Kationenaustauschharzen, Ausschlußgelen, Gelpermeationsgelen, Affinitätsgelen, Hydrophobchromatographie-(HIC-)Gelen, Verdrängungs-(Displacement-)Harzen, Umkehrphasen-(Reversed Phase-)Gelen, Elektrophorese-Gelen und anderen in der Praxis eingesetzten Trennmedien ausgewählt werden, was eine Vielzahl von Möglichkeiten für kombinierte Trennungen bietet, wie nachstehend detaillierter beschrieben. Falls eine der Zonen im erfindungsgemäßen Chromatographen eine Elektrophoresezone ist, wird als Teilchenbett für diese Zone natürlich ein Elektrophorese-Gel gewählt.

Die Trennschicht bzw. Trennschichten werden erfindungsgemäß bevorzugt aus Membranen, nicht-porösem, inertem Teilchenmaterial, insbesondere Glasperlen, und - speziell für etwaige Elektrophoresezonen - aus elektrisch nicht-leitendem Material ausgewählt.

In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung ist die oberste Zone des Teilchenbetts mit einer Deckschicht bedeckt und/oder mit einer Grundschicht unterlegt, wobei die Deck- und die Grundschicht vorzugsweise aus demselben Material wie die Trennschicht(en) bestehen.

Besonders bevorzugt umfaßt ein erfindungsgemäßer Chromatograph zumindest eine Elektrophoresezone bzw. zumindest eine Ausschlußgelzone und zumindest eine Adsorberharzzone, wobei insbesondere zumindest eine Adsorberharzzone ein Ionentauscherharz enthält, womit sich z.B. Proteine (nacheinander entsprechend ihrer Größe und ihrer Ladung), sowie zahlreiche biotechnologische Verfahrensprodukte, wie z.B. Enzyme, h-EGF ("human epidermal growth factor", Human-Epidermalwachstumsfaktor) und Immunglobuline, äußerst selektiv und hochauflösend auftrennen und reinigen lassen.

In einer Ausführungsform der Erfindung kann auch am inneren und/oder äußerem Umfang der annularen Trennsäule (11) ein Temperier-(d.h. Heiz- bzw. Kühl-)Mantel vorgesehen sein, um die jeweils zur Trennung optimale Temperatur einstellen zu können.

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Beispielen und unter Bezugnahme auf die beiliegenden Zeichnungen beschrieben, worin die Fig. 1a) und 1b) schematische Darstellungen eines gemäß vorliegender Erfindung einsetzbaren Annularchromatographen mit 2 bzw. 3 Trennzonen sind, Fig. 2a) eine schematische Teilansicht eines Schnitts durch einen weiteren erfindungsgemäßen Annularchromatographen mit Elektrophoresezone ist und Fig. 2b) eine schematische Ausschnittsvergrößerung des strichlierten Bereichs aus Fig. 2a) ist.

In den Fig. 1a) und 1b) sind zwei Varianten des Annularchromatographen der vorliegenden Erfindung schematisch dargestellt. In Fig. 1a) ist eine Ausführungsform mit zwei, in Fig. 1b) eine mit drei Trennzonen des Teilchenbetts dargestellt. Diese Zonen 1 und 2, bzw. 1, 2 und 3, bestehen vorzugsweise aus Trennharzen, ausgewählt aus z.B. Anionenaustauschharzen, Kationenaustauschharzen, Ausschlußgelen, Affinitätsgelen, Hydrophobchromatographie-(HIC-)Gelen, Verdrängungs-(Displacement-)Harzen, Elektrophoresegelen, sowie gegebenenfalls aus anderen auf dem Gebiet üblichen stationären Phasen, wie z.B. Kieselgel, Aluminiumoxid, etc. Diese breite Palette an Auswahlmöglichkeiten ergibt eine große Vielfalt an Kombinationen von zweien oder mehreren dieser Trennmittel.

So umfaßt die Erfindung beispielsweise folgende Kombinationen zweier stationärer Phasen:

- Kationenaustauscher - Anionenaustauscher
- Kationenaustauscher - Ausschlußgel
- Anionenaustauscher - Ausschlußgel
- Kationenaustauscher - Affinitätsgel

- Anionenaustauscher - Affinitätsgel
- Kationenaustauscher - Hydrophobchromatographie-Gel
- Anionenaustauscher - Hydrophobchromatographie-Gel
- Ausschlußgel - Affinitätsgel
- Ausschlußgel - Hydrophobchromatographie-Gel
- Hydrophobchromatographie-Gel - Affinitätsgel

sowie derartige Kombinationen mit einem Elektrophoresegel anstelle eines der beiden obigen Gele oder zusätzlich dazu (Drei-Zonen-Chromatographie). Die obige Aufstellung der binären Kombinationsmöglichkeiten beschreibt nicht, wie die Gele in der Säule relativ zueinander angeordnet sind, d.h., welches das obere und welches das untere Gel darstellt. Dies hängt einzig und allein vom Trennproblem ab.

Beispiele für die in der Erfindung einsetzbaren Trenntechniken sind u.a.:

- Ionenaustauschchromatographie: z.B. Mono S (Pharmacia) oder Toyopearl DEAE 650S (TosoHaas);
- Umkehrphasen-(Reversed Phase-)Chromatographie: z.B. Amberchrom CG-161cd (Rohm & Haas) oder Sephasil C8 (Pharmacia);
- Hydrophobchromatographie: Phenyl Sepharose (Pharmacia) oder TSK Gel Phenyl 5PW (TosoHaas);
- Ausschluß-(Size Exclusion-) und Gelpermeationschromatographie: z.B. Sephadex G15 (Pharmacia) oder Toyopearl HW 40F (TosoHaas);
- Affinitätschromatographie: z.B. Toyopearl AF Tresyl-650M (TosoHaas) oder EAH Sepharose-4B (Pharmacia);
- Adsorptionschromatographie: z.B. Amberlite XAD (Rohm & Haas) oder Purolite MN200 (Purolite).

Im Schutzmfang der Erfindung sind auch Kombinationen zweier oder mehrerer Gele desselben Typs, aber z.B. von unterschiedlichen Herstellern stammend, enthalten. Bei-

spielsweise können auch zwei Kationenaustauschgele oder zwei Ausschlußgele übereinander angeordnet werden (z.B. Sephadex G15 über Toyopearl HW 40F o.ä.).

Erfindungsgemäß besonders bevorzugt werden Annularchromatographen mit einem Teilchenbett aus zumindest einer Ausschlußgelzone und zumindest einer Adsorberharzzone, wobei insbesondere zumindest eine Adsorberharzzone ein Ionenaustauschharz enthält, sowie Annularchromatographen mit zumindest einem Elektrophoresegel in einer der Zonen.

Die zwei bzw. drei Gele werden nacheinander in den Ringspalt einer Annular-Säule 11 aus gegenüber den Komponenten der Trennlösungen inertem Material, vorzugsweise Glas, eingebracht, wobei jede der Gelzonen mit einer Trennschicht 5 bedeckt wird, bevor die nächste darauf aufgebracht wird, um eine Durchmischung der verschiedenen Zonenmaterialien zu verhindern. Den Abschluß des Teilchenbetts nach oben hin bildet in beiden Fällen eine Deckschicht 8. In Fig. 1a) ist zusätzlich eine Grundsicht 9 dargestellt, die (zusätzlich zu einer - nicht dargestellten - porösen Bodenplatte, z.B. Fritte, Membranscheibe, etc.) dazu dient, ein Austreten von Teilchenmaterial am Boden der Säule zu verhindern. Das Material für die Trenn-, die Deck- und die Grundsichten 5, 8, 9 wird ausgewählt aus Membranen sowie nicht-porösem, gegenüber sämtlichen Komponenten der jeweiligen Trennlösungen inertem Teilchenmaterial und kann für alle drei Schichten gleich oder unterschiedlich sein, wobei es aber speziell für elektrophoretische Trennungen nicht elektrisch leitend sein darf. Erfindungsgemäß bevorzugt sind Glasperlen, da diese bei praktisch allen gängigen Anwendungen inert und leicht aufzubringen sind.

Für den Annularchromatographen aus Fig. 1a) erfolgt somit das Beschicken in der Reihenfolge 9-2-5-1-8, in Fig. 1b) in der Reihenfolge 3-5-2-5-1-8.

Die übrigen Bauteile des Annularchromatographen können in herkömmlicher Weise ausgeführt sein. So ist die Säule 11 (von einem nicht dargestellten Motor angetrieben)

rotierbar auf einer Achse 12 gelagert und wird über Anschlußleitungen 13 für Feed und Eluenten und einen fix an der Achse montierten Verteilerkopf 14 gespeist, wobei die Zufuhrkanälen 15 des Verteilerkopfes 14 vorzugsweise in die Deckschicht 8 ein-tauchen, um gleichmäßige Aufgabe zu gewährleisten. Die Kanäle können die üblichen Ausgestaltungsformen, d.h. Einzel-, Mehrfach- oder Schlitzdüsen oder dergleichen, auf-weisen, für die Erfindung bevorzugt werden jedoch an den Säulenumfang angepaßt gekrümmte Schlitzdüsen unterschiedlicher Breite, um die Feed- und Eluentenströme möglichst genau aufeinander abstimmen zu können.

Am unteren Ende der Säulen sind Auslaßkanäle bzw. -rörchen 16 zur Sammlung der Eluate vorgesehen. Diese Auslässe 16 können entweder mit der Säule 11 verbunden sein (d.h. sie rotieren mit dieser um Achse 12) oder aber an der Achse 12 fixiert sein und z.B. über einen Schleifring mit der sich relativ dazu drehenden Säule in Kontakt stehen, wobei letztere Ausführungsform bevorzugt wird.

Fig. 2a) zeigt eine Teilansicht einer Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Annular-chromatographen mit einem Elektrophorese-Trennschritt, nämlich die Elektrophorese-Trennzone 4, die zu jeweils einer anderen darüber- und darunterliegenden (nicht darge-stellten) Zone hin mittels je einer Trennschicht 5 aus elektrisch nicht leitendem Material begrenzt ist. Sowohl am oberen als auch am unteren Ende der Elektrophoresezone 4, vorzugsweise direkt angrenzend an die jeweilige(n) Trennschicht(en), sind Schleif-kontakte vorgesehen, bestehend aus je einem an der Außenseite der Achse 12 montier-ten Leiterring 6, der über jeweils einen Netzanschluß 10 mit Strom versorgt wird, sowie aus einem an der Innenseite der Säule 11 vorgesehenen ringförmigen Stromabnehmer 7, der eng am Leiterring 6 anliegt und in elektrischem Kontakt damit steht. Letzterer ist im Bereich des Schleifkontakte - entweder punktuell oder flächig - durch den Säulenmantel hindurch geführt, um im Inneren der Säule die für die elektrophoretische Trennung erforderliche elektrische Spannung aufzubauen.

Fig. 2b) stellt eine vergrößerte Ansicht des strichlierten Bereichs aus Fig. 2a) dar und zeigt den Schleifkontakt in etwas detaillierterer Form.

Es folgen spezifische Anwendungsbeispiele für die vorliegende Erfindung. Die Erfindung ist allerdings keineswegs auf diese Einsatzmöglichkeiten beschränkt. Bevorzugte Einsatzgebiete für erfindungsgemäße Annularchromatographen sind z.B. Trennungen von unedlen Metallen und Edelmetallen sowie zahlreiche Trennungen und Reinigungsschritte in der Biotechnologie.

Beispiel 1: Kationenaustauscher - Ausschlußgel:

Ionenaustausch-/Größenausschluß-Chromatographie

**Flüssigchromatographische Trennung der Platingruppenmetalle unter gleichzeitiger Entfernung der unedlen Metalle**

Die Platingruppenmetalle Rhodium, Palladium, Platin und Iridium können mittels präparativer Annularchromatographie kontinuierlich voneinander getrennt werden. Gleichzeitig anwesende unedle Metalle wie beispielsweise Eisen, Kupfer, Nickel oder Kobalt können ebenfalls kontinuierlich von den Edelmetallen getrennt werden.

Die chromatographische Trennung der Platingruppenmetalle unter Verwendung von Austauschergelen (z.B. Sephadex, Toyopearl oder Biogel) wurde bereits in US-A-4.885.143 beschrieben. Konzentrierte Edelmetall-Lösungen aus den Leach-Prozessen der Scheidereien enthalten in der Regel zusätzlich unedle Metalle wie Eisen, Kupfer oder Nickel in unterschiedlichen Konzentrationen.

Nach dem Leach-Prozeß liegt die Edelmetall-Lösung meist in konzentrierter Salzsäure vor. Aufgrund der hohen Chloridkonzentration liegen die Edelmetalle alle als anionische Chlorokomplexe vor. Unedle Metalle haben die Eigenschaft, sich unter bestimmten Bedingungen an einen Kationenaustauscher zu binden, während die Edelmetalle als anionische Komplexe ohne Retention durch den Kationenaustauscher laufen. Diese Eigenschaft kann man sich zunutze machen, um im ersten Verfahrensschritt die unedlen

Begleitmetalle von den Edelmetalle zu trennen und in einem zweiten Verfahrensschritt die Edelmetalle untereinander aufzutrennen. Mit dem P-CAC-System der vorliegenden Erfindung wird das in einfachster apparativer Bauweise möglich.

Eine Säule, wie in Fig. 1a) dargestellt, wird bis zu einer gewissen Höhe (genaue Versuchsbedingungen nachstehend in den Tabellen 1 und 2) mit einem Ausschlußgel 2 (z.B. Sephadex, Toyopearl oder Biogel) gefüllt und darüber Glasperlen 5 geschichtet ( $= 150-240 \mu\text{m}$ ); über diese Glasperlenschicht 5 wird ein Kationenaustauscher 1 (z.B. Dowex, Purolite, Amberlite) und darauf schließlich erneut eine Glasperlenschicht 8 geschichtet.

Die Feedlösung wird an der radialen Position  $0^\circ$  in die Annularsäule eingepumpt. Dabei taucht der Feedkanal 15 in die obere Glasperlenschicht 8 ein. Als Haupteluens (Top-Eluens) dient 0,5-1 m HCl. Die Edelmetalle laufen ohne Wechselwirkung durch die Kationenaustauscherschicht 1 und werden dann in der Ausschlußgelschicht 2 voneinander getrennt. Am Ende der Säule können die einzelnen Fraktionen von Rhodium (Rh), Palladium (Pd), Platin (Pt) und Iridium (Ir) getrennt aufgefangen werden.

Die unedlen Metalle adsorbieren an den Kationenaustauscher und werden an der radialen Position, an der das letzte Edelmetall eluiert (Ir) mit einem Step-Eluenten (2 m oder höher HCl) gestript. Die 2 m HCl desorbiert die unedlen Metalle vom Kationenaustauscher und treibt sie zur Ausschlußgelschicht. Dort haben die unedlen Metalle keinerlei Wechselwirkung mit der stationären Phase. Die unedlen Metalle können nun als gemeinsame Fraktion gewonnen werden.

Im speziellen wird eine Lösung (6 m HCl) folgender Konzentration kontinuierlich in die einzelnen Edelmetalle und in eine Fraktion, welche die unedlen Metalle enthält, getrennt.

Tabelle 1

## Konzentration der Metalle in der Feedlösung

|            |            |           |           |
|------------|------------|-----------|-----------|
| Pt: 30 g/l | Pd: 15 g/l | Rh: 3 g/l | Ir: 1 g/l |
| Fe: 4 g/l  | Co: 4 g/l  | Ni: 4 g/l | Cu: 4 g/l |

Eine 26 cm hohe Schicht Sephadex G-15 wurde mit 5 cm Glasperlen überschichtet. Auf diese Schicht wurde eine 5 cm dicke Schicht Dowex 50-W X8 aufgegeben, welche wiederum mit einer Glasperlenschicht überlagert wurde. Eluiert wurde die Lösung mit 0,5 m HCl. Die Edelmetalle durchliefen die Kationenaustauscherschicht 1 ohne Wechselwirkung und trennten sich auf der Sephadex-Schicht 2 auf. Dabei bildeten sich 4 verschiedenen gefärbte Banden aus - Rh-Bande (rot), Pd-Bande (braun), Pt-Bande (gelb) und Ir-Bande (braun).

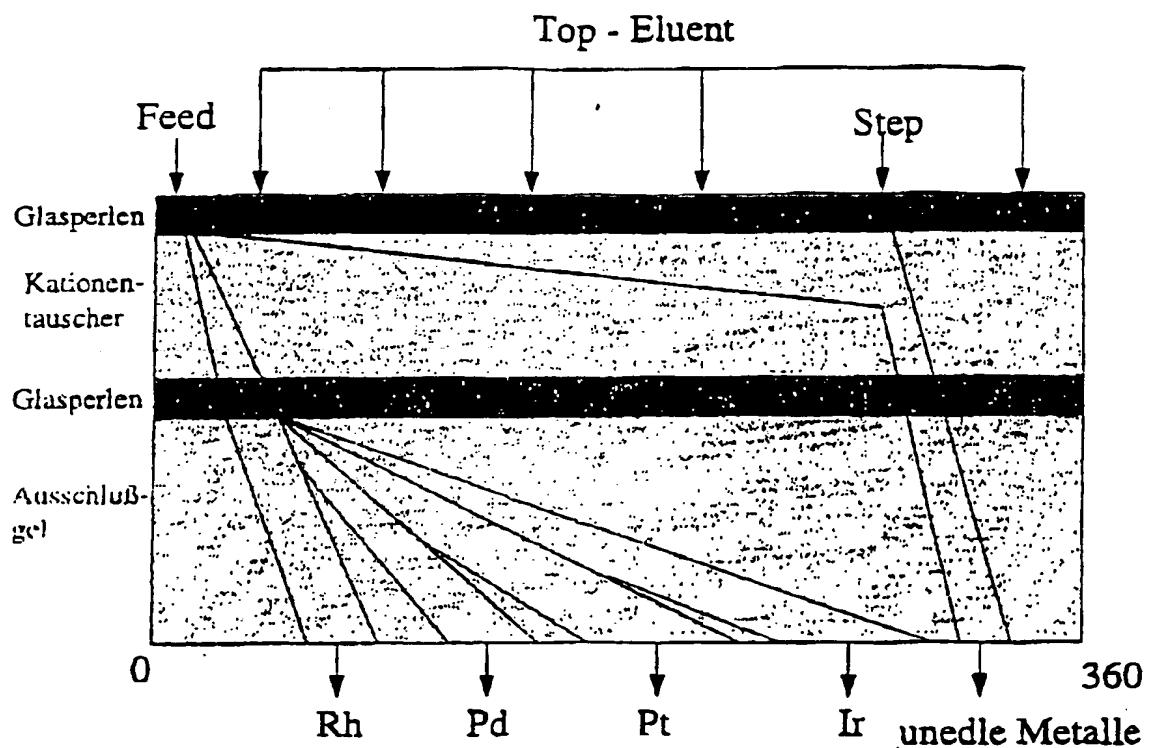
In einer radialen Position von 270° relativ zum Feedaufgabepunkt wurde der Step-Eluens (2 m HCl) zum Strippen für die unedlen Metalle aufgegeben. Das Step-Eluens desorbierte die unedlen Metalle vom Kationenaustauscher, und es bildete sich eine grünlich-gelbe Bande, die ohne Wechselwirkung durch die Säule läuft. Die unedlen Metalle konnten als gemeinsame Fraktion nach der Iridiumfraktion gewonnen werden.

Tabelle 2

## Versuchsbedingungen

| Fließrate<br>Top-Eluens | Fließrate<br>Step-Eluens | Fließrate<br>Feed | Rotationsrate | Querschnitts-<br>fläche Ringspalt |
|-------------------------|--------------------------|-------------------|---------------|-----------------------------------|
| 18 ml/min               | 4 ml/min                 | 0,4 ml/min        | 125°/h        | 24,4 cm <sup>2</sup>              |

Höhe der Säule: 41 cm, davon  
 26 cm Sephadex G-15  
 5 cm Glasperlen (d = 150-240 µm)  
 5 cm Dowex 50 W-X8 in der H<sup>+</sup>-Form  
 5 cm Glasperlen (d = 150-240 µm).



Sind außerdem noch Ru und Os im Trengemisch enthalten, so eluiert Ru zwischen Rh und Pd und Os nach Ir (siehe Beispiel 2).

Beispiel 2: Adsorptionsharz - Ausschlußgel

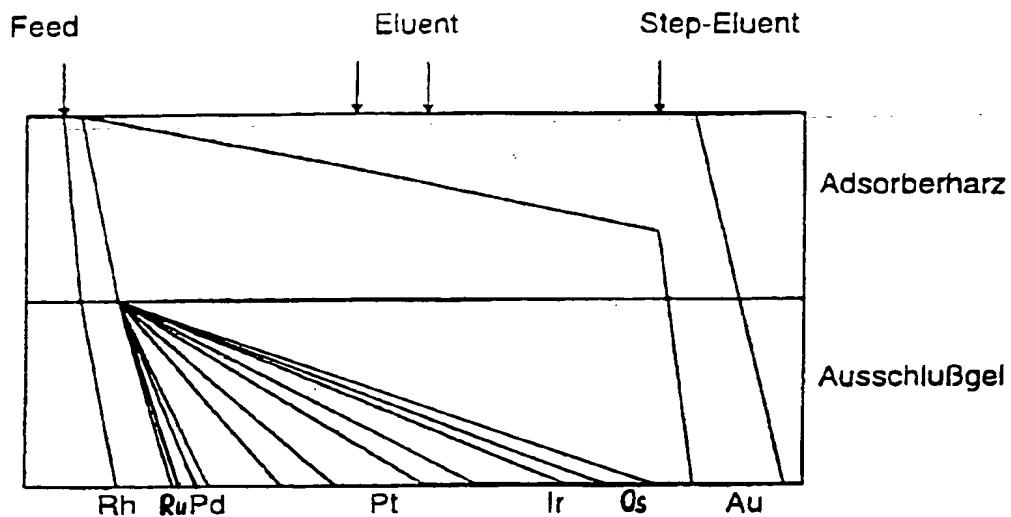
Adsorptions-/Größenausschluß-Chromatographie

**Selektive Abtrennung von Gold aus einer Edelmetall-Lösung und gleichzeitige Trennung der Platingruppenmetalle**

Das Ausschlußgel wird in den P-CAC gefüllt (zumindest bis zur halben Höhe), über das Ausschlußgel kommt eine Trennschicht (Glasperlen oder Membran), über diese Schicht wird das Adsorptionsharz (Amberlite XAD7 oder auch Purolite MN 200) gefüllt.

Eine Edelmetall-Lösung, die alle Platingruppenmetalle (aber zumindest zwei davon) und Gold enthält, wird als Feed für den P-CAC verwendet. Gold wird vom Adsorberharz

selektiv adsorbiert, während die anderen Platingruppenmetalle unretardiert durch die Adsorberschicht laufen und auf dem Ausschlußgel aufgetrennt werden. Nach der Elution der letzten Komponente wird mit einem Step-Eluenten das Gold vom Adsorberharz gestript.



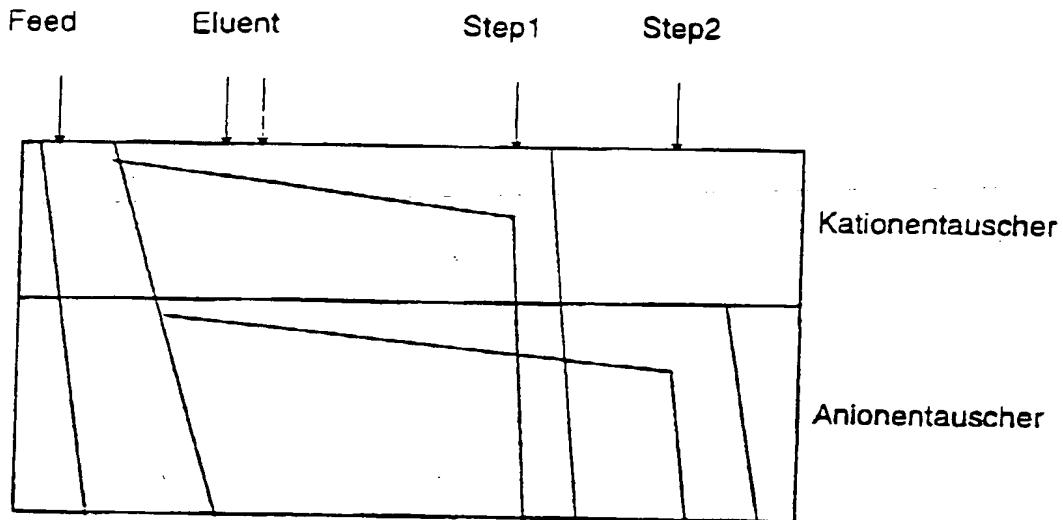
### Beispiel 3: Kationenaustauscher - Anionenaustauscher

#### Ionenaustausch-Chromatographie

#### **Abtrennung der unedlen Metalle von einer Rh/Ir-Lösung und anschließende Trennung von Rhodium und Iridium**

Der Anionenaustauscher wird zumindest bis zur halben Höhe in den P-CAC gefüllt. Über den Anionenaustauscher wird eine Trennschicht gefüllt (Membran oder Glasperlen entsprechender Größe), und über die Trennschicht der Kationenaustauscher bis zur maximalen Füllhöhe. Eine Metall-Lösung, die Rhodium und Iridium sowie Nicht-Edelmetalle wie Eisen, Nickel, Kobalt oder Kupfer enthält, wird als Feed in die Annularsäule gepumpt. Die unedlen Metalle adsorbieren am Kationenaustauscher, während Rhodium und Iridium bis zum Anionenaustauscher durchlaufen. Am Anionenaustauscher adsorbiert Ir(IV), und Rhodium läuft durch. Nachdem alles Rhodium eluiert ist, werden an

dieser Winkelposition mit dem Step-Eluenten 1 die unedlen Metalle eluiert. Nach dieser Elution erfolgt die Reduktion von Ir(IV) zu Ir(III) mit dem Step-Eluenten 2.



Beispiel 4: Anionenaustauscher - Ausschlußgel

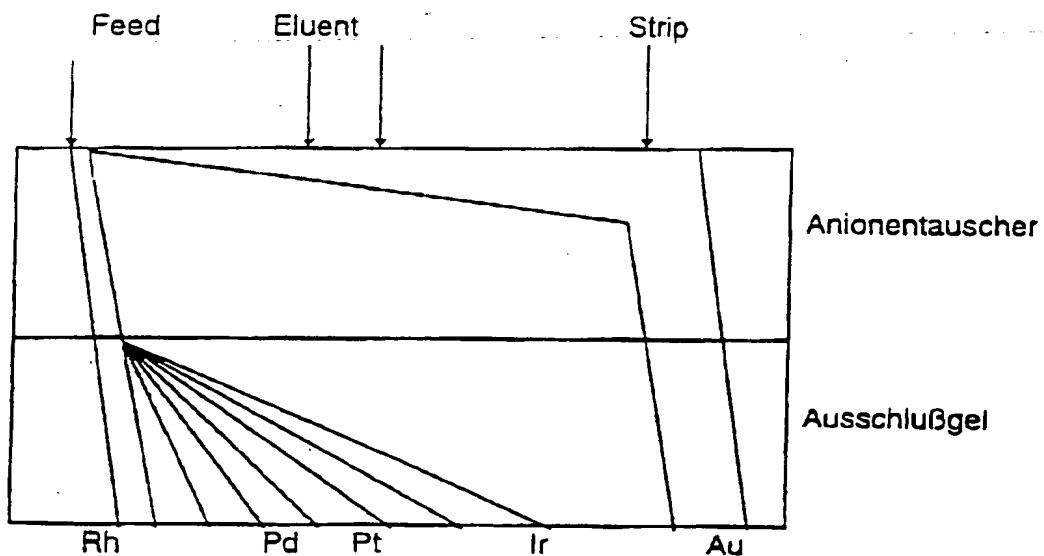
Ionenaustausch-/Größenausschluß-Chromatographie

**Abtrennung von Goldcyanid aus einer Edelmetall-Lösung unter gleichzeitiger**

**Auftrennung der Edelmetalle**

Der P-CAC wird zumindest bis zur halben Füllhöhe mit einem Ausschlußgel befüllt, dann mit einer Trennschicht überlagert, und diese wiederum mit einem Anionenaustauscher überschichtet. Eine Edelmetall-Lösung, die neben Gold als Cyanid-Komplex auch noch die Platingruppenmetalle enthält, wird als Feed-Lösung auf den Ringspalt aufgebracht. Das Goldcyanid bindet sich als anionischer Komplex an den Anionenaustauscher, die restlichen Platingruppenmetalle durchlaufen den Anionenaustauscher ohne Wechselwirkung und werden auf dem Ausschlußgel aufgetrennt. Nach dem Winkel, an dem das letzte Platingruppenmetall (Iridium) die Säule verläßt, wird eine Strip-Lösung zur Desorption des Goldes in den Ringspalt eingebracht.

Es ist auch eine Kombination von Anionenaustauschern und Ausschlußgelen in der Biotechnologie denkbar; z.B. zur Gewinnung und Reinigung von monoklonalen Antikörpern. Dabei können durch den Anionenaustauscher Pyrogene, Nukleinsäuren und Proteasen entfernt werden; im Ausschlußgel können anschließend die Salze der Pufferlösung entfernt werden.



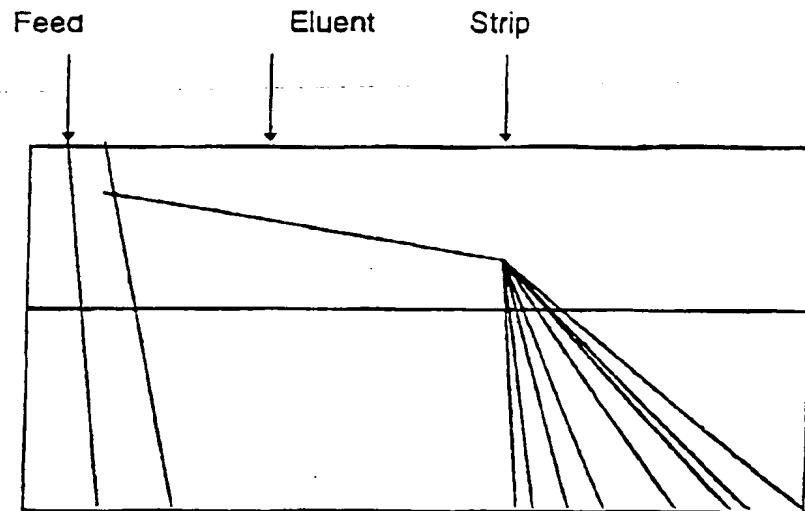
#### Beispiel 5: Affinitätsgel - Ausschlußgel

#### Affinitäts-/Größenauschluß-Chromatographie

#### **Abtrennung von unedlen Metallen aus einer Edelmetall-Lösung unter nachfolgender Trennung der Edelmetalle**

Eine P-CAC-Säule wird zu mindestens 50 % der Füllhöhe mit einem Ausschlußgel gefüllt, mit einer Trennschicht überlagert und mit Superlig-Gelen bis zur endgültigen Füllhöhe beschickt (Superlig-Gele sind Gele mit Kronenether als funktionelle Gruppe; Trademark von IBC Advanced Technology). Eine Edelmetall-Lösung, die einen hohen Anteil an unedlen Metallen enthält, wird als Feed auf den Ringspalt des P-CAC aufgebracht. Die unedlen Metalle haben keine Affinität zum Superlig-Gel und eluieren daher

durch die gesamte Säule und können als gemeinsame Fraktion aufgefangen werden. Die Edelmetalle werden vom Superlig-Gel gestript und trennen sich auf dem Ausschlußgel entsprechend der Reihenfolge Rh - Pd - Pt - Ir auf.



Ähnliche Applikationen sind mit stationären Phasen denkbar, die Komplexbildner (wie Dithizone, Dehydrodithizone, Hydroxychinolinate, Pyridylazo-naphtholate etc.) als reaktive Gruppen gekoppelt haben. Mit diesen stationären Phasen ist es aber nur unter schwierigen Bedingungen möglich, die Edelmetalle qualitativ voneinander zu trennen (pro Metall muß ein Strip-Eluens verwendet werden). Es ist daher nicht sinnvoll, diese stationären Phasen noch mit einer anderen Phase zu überlagern, da dies die Elutionsbedingungen zusätzlich erschweren und den Prozeß unwirtschaftlich machen würde.

Beispiel 6: Kationenaustauscher - AnionenaustauscherIonenaustausch-Chromatographie**Zweistufen-Reinigung einer Cellulase**

Der Anionenaustauscher als obere Schicht (Pharmacia Mono Q) dient zur Vorreinigung der Cellulase; eluiert wird mit einem Tris.HCl-Puffer. Die gewonnene Fraktion, in der sich die Cellulase befindet, wird anschließend in einem Kationenaustauscher als untere Schicht (Pharmacia Mono S) mit einem Acetat-Puffer als Eluens weiter fraktioniert. Mit dem Kationenaustauscher kann eine sehr hohe Auflösung erreicht werden, sodaß die Cellulase in reinem Zustand gewonnen werden kann.

Beispiel 7: Kationenaustauscher - AusschlußgelIonenaustausch-/Größenauschluß-Chromatographie**Gewinnung von monoklonalem IgG<sub>2B</sub> aus einer Fermentationsbrühe**

Eine vorläufige Reinigung und Konzentrierung des Antikörpers wird mit dem Kationenaustauscher als obere Phase (Pharmacia S Sepharose High Performance) erreicht. Dabei wird MES mit NaCl als Puffer verwendet. Der Pool (Fraktion, die auch den Antikörper enthält) wird anschließend über ein Ausschlußgel (Superdex 200) als untere Phase mit einem sterilen Natriumchlorid-Puffer von Dimeren/Oligomeren sowie von Transferrin befreit.

Beispiel 8: Anionenaustauscher - AusschlußgelIonenaustausch-/Größenauschluß-Chromatographie**Reinigung von Human-Epidermalwachstumsfaktor (h-EGF, Human Epidermal Growth Factor), exprimiert als extrazelluläres Produkt durch *Saccharomyces cerevisiae***

Der Anionenaustauscher (Pharmacia Q - Sepharose) als obere Phase dient zur Vorreinigung (Reinigung aufgrund der Ladung) des Wachstumsfaktors, die untere Phase, das Ausschlußgel (Pharmacia Superdex 75) dient der Endreinigung des Wachstumsfaktors.

Beispiel 9: Hydrophobchromatographie-(HIC-)Gel - AusschlußgelAffinitäts-/Größenauschluß-Chromatographie**Gewinnung von Human-Hypophysen-Prolactin (Human pituitary prolactin)**

Die obere stationäre Phase (HIC-Gel, Pharmacia Phenyl Sepharose CL) dient zur Erstreinigung und Aufkonzentrierung des Prolactins (Aufkonzentrierung um den Faktor 7). Im zweiten Schritt wird das Prolactin auf einem Ausschlußgel (z.B. Pharmacia Sephadex G100) endgereinigt.

Beispiel 10: Kationenaustauscher - Hydrophobchromatographie-GelIonenaustausch-/Affinitäts-Chromatographie**Gewinnung von  $\alpha$ -2-Makroglobulin**

Mit dem Kationenaustauscher (obere stationäre Phase, z.B. Pharmacia Mono S) kann ein Proteinpool gewonnen werden, der Proteine gleicher Ladung enthält, unter anderem auch das Makroglobulin. Das Makroglobulin wird in der zweiten Schicht, dem HIC-Gel (z.B. Pharmacia Phenyl Sepharose) bis zur Homogenität gereinigt.

Beispiel 11: Anionenaustauscher - Hydrophobchromatographie-GelIonenaustausch-/Affinitäts-Chromatographie**Reinigung einer rekombinanten reversen Transkriptase von HIV**

In der oberen Phase, dem Anionenaustauscher (z.B. Pharmacia DEAE Sepharose) wird die Fermentationsbrühe nach Ladung getrennt. Der Pool, in dem sich die Transkriptase befindet, durchläuft die zweite Schicht, das HIC-Gel (z.B. Pharmacia Phenyl Sepharose High Performance). Man gewinnt durch die unterschiedliche Hydrophobizität nach dieser Schicht die Transkriptase in reiner Form.

Beispiel 12: Kationenaustauscher - Anionenaustauscher, mit einer der stationärenPhasen im Verdrängungs-(Displacement-)ModusIonenaustausch-/Verdrängungs-Chromatographie**Proteintrennung**

In einen Annularchromatographen wird ein Anionenaustauscher (z.B. Pharmacia Mono Q) eingefüllt. Auf diesen Anionenaustauscher wird eine inerte Schicht, z.B. Glasperlen oder eine Membran, geschichtet, und darüber ein Kationenaustauscher eingefüllt (z.B. Pharmacia Mono S). Eine Mischung unterschiedlicher Proteine wird auf dem Kationenaustauscher aufgrund unterschiedlicher Ladung getrennt, die getrennten Fraktionen werden am Anionenaustauscher unter Verwendung eines Verdrängungsreagens oder Displacers (z.B. Nalcolyte) aufkonzentriert. Somit lässt sich eine Trennung und eine simultane Aufkonzentrierung kombinieren.

Beispiel 13: Ausschlußgel - Elektrophorese-Gel

Größenauschluß-Chromatographie/Elektrophorese

**Proteintrennung**

Das Elektrophorese-Gel bildet die untere Schicht im P-CAC, die mit einem Ausschlußgel überschichtet ist. Werden nun Proteine unterschiedlicher Ladung und unterschiedlicher pI-Werte auf das Ausschlußgel aufgebracht, trennen sich diese aufgrund der Größe. Die elektrophoretische Schicht übernimmt dann die zusätzliche Auf trennung der Proteine aufgrund ihrer Ladung.

Beispiel 14: Ausschlußgel - Kationenaustauscher, mit dem Kationenaustauscher im Verdrängungs-(Displacement-)Modus

Größenauschluß-/Ionenaustausch-Chromatographie

**Aufarbeitung einer Aminosäuremischung unter gleichzeitiger Abtrennung von Proteinen**

Die obere stationäre Phase, ein Ausschlußgel (z.B. Pharmacia Sephadex G25) dient zur Abtrennung von Proteinen (z.B. Albumine) aus einer Feed-Lösung, welche die Aminosäuren L-Glutaminsäure, L-Valin und L-Leucin enthält. Die Trennung im Ausschlußgel ergibt eine Fraktion, welche die Proteine enthält, und eine Fraktion, welche die Aminosäuren enthält. In der zweiten Schicht werden die Aminosäuren auf einem Kationenaustauscher (z.B. Dowex 50 W-X8) mit einem Displacer (z.B. 0,1 n NaOH) getrennt und gleichzeitig aufkonzentriert. Die Aminosäuren werden in der Reihenfolge Glutamin-

säure - Valin - Leucin gewonnen. Dem Displacer muß eine Regenerierlösung (z.B. verdünnte  $H_2SO_4$ ) folgen, um das Gelbett in den Ausgangszustand zu bringen.

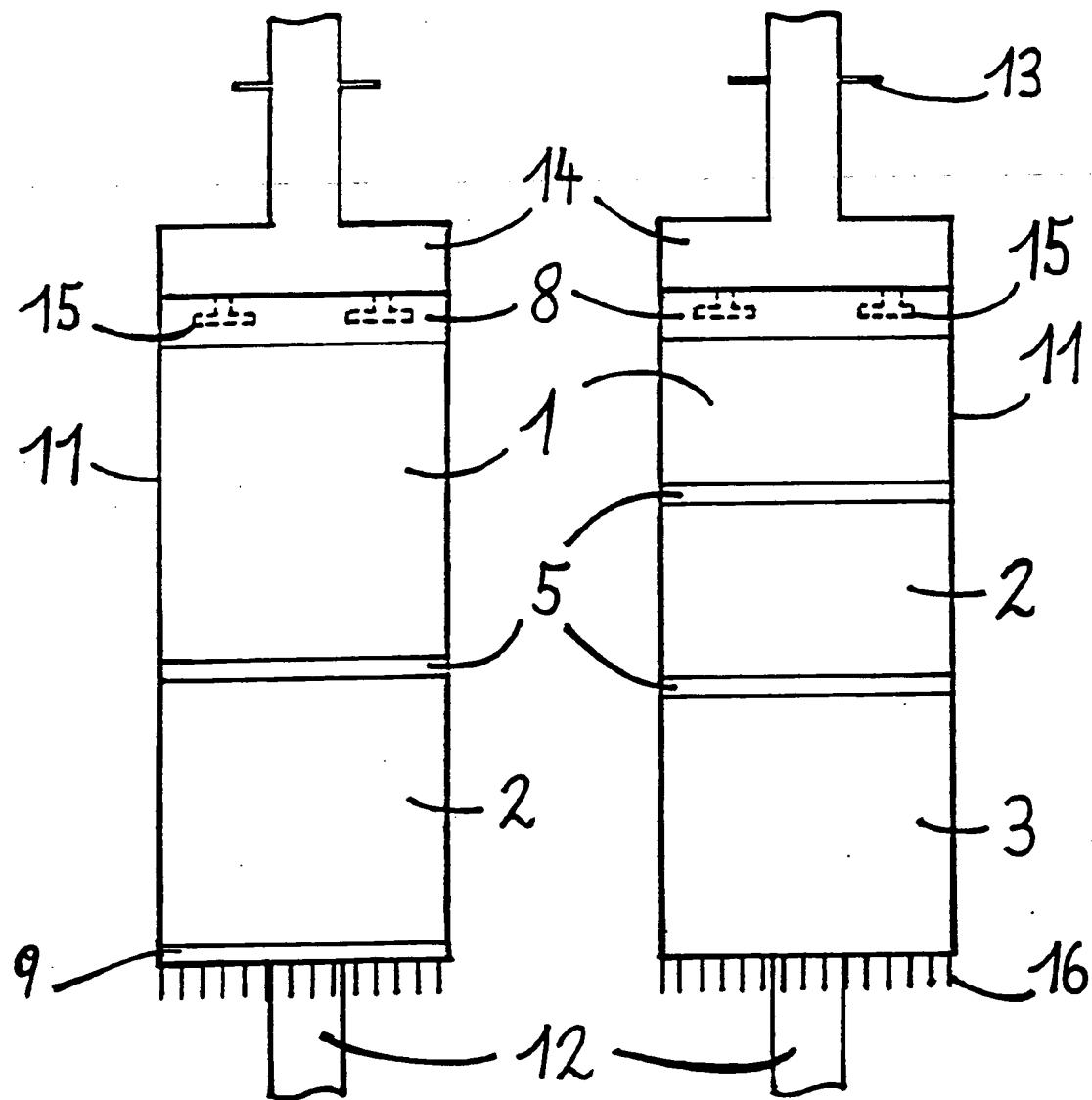
Das Beispiel der Displacement-Elution ist ebenfalls nicht auf die Anwendung im Kationenaustausch beschränkt.

Wie aus der obigen Beschreibung hervorgeht, bietet der vorliegenden Erfindung einen neuen Annularchromatographen mit einem aus mehreren unterschiedlichen Zonen bestehenden Teilchenbett, mit dem mehrere Arten chromatographischer Trennungen kontinuierlich, in einem Schritt und somit rascher und kostengünstiger durchgeführt werden können, als dies nach dem Stand der Technik bislang möglich war.

## Patentansprüche:

1. Annularchromatograph mit einer Beschickung in Form eines Teilchenbetts, dadurch gekennzeichnet, daß das Teilchenbett zumindest zwei übereinander angeordnete Zonen (1, 2, 3, 4) aufweist, die unterschiedliches Bettmaterial enthalten und vorzugsweise durch jeweils zumindest eine Trennschicht (5) voneinander getrennt sind.
2. Annularchromatograph nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest eine der Zonen (4) durch Vorsehen von elektrischen Anschlüssen, vorzugsweise in Form von Schleifkontakte, (6, 7) als Elektrophoresezone zur Durchführung von elektrophoretischen Trennungen ausgebildet ist.
3. Annularchromatograph nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektrophoresezone (4) durch jeweils zumindest eine elektrisch nicht-leitende Trennschicht (5) zu der bzw. den übrigen Zone(n) (1, 2, 3) hin begrenzt ist.
4. Annularchromatograph nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Bettmaterial für die zumindest zwei Zonen (1, 2, 3, 4) aus Anionenaustauschharzen, Kationenaustauschharzen, Ausschlußgelen, Gelpermeationsgelen, Affinitätsgelen, Hydrophobchromatographie-(HIC-)Gelen, Verdrängungs-(Displacement-)Harzen, Umkehrphasen-(Reversed Phase-)Gelen und Elektrophorese-Gelen ausgewählt ist.
5. Annularchromatograph nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Bettmaterial für die Elektrophoresezone (4) aus Elektrophoresegelen ausgewählt ist.
6. Annularchromatograph nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die zumindest eine Trennschicht (5) aus Membranen, nicht-porösem, inertem Teilchenmaterial, vorzugsweise Glasperlen, und elektrisch nicht-leitendem Material ausgewählt ist.

7. Annularchromatograph nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Teilchenbett mit einer Deckschicht (8) bedeckt und/oder mit einer Grundschicht (9) unterlegt ist, wobei die Deck- und die Grundschicht (8, 9) vorzugsweise aus demselben Material wie die Trennschicht(en) (5) bestehen.
8. Annularchromatograph nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Teilchenbett zumindest eine Elektrophoresezone enthält.
9. Annularchromatograph nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Teilchenbett zumindest eine Ausschlußgelzone und zumindest eine Adsorberharzzone enthält.
10. Annularchromatograph nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest eine Adsorberharzzone ein Ionenaustauschharz enthält.
11. Annularchromatograph nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß am inneren und/oder äußeren Umfang der annularen Trennsäule (11) ein Temperier-(d.h. Heiz- bzw. Kühl-)Mantel vorgesehen ist.



α) Fig. 1 β)

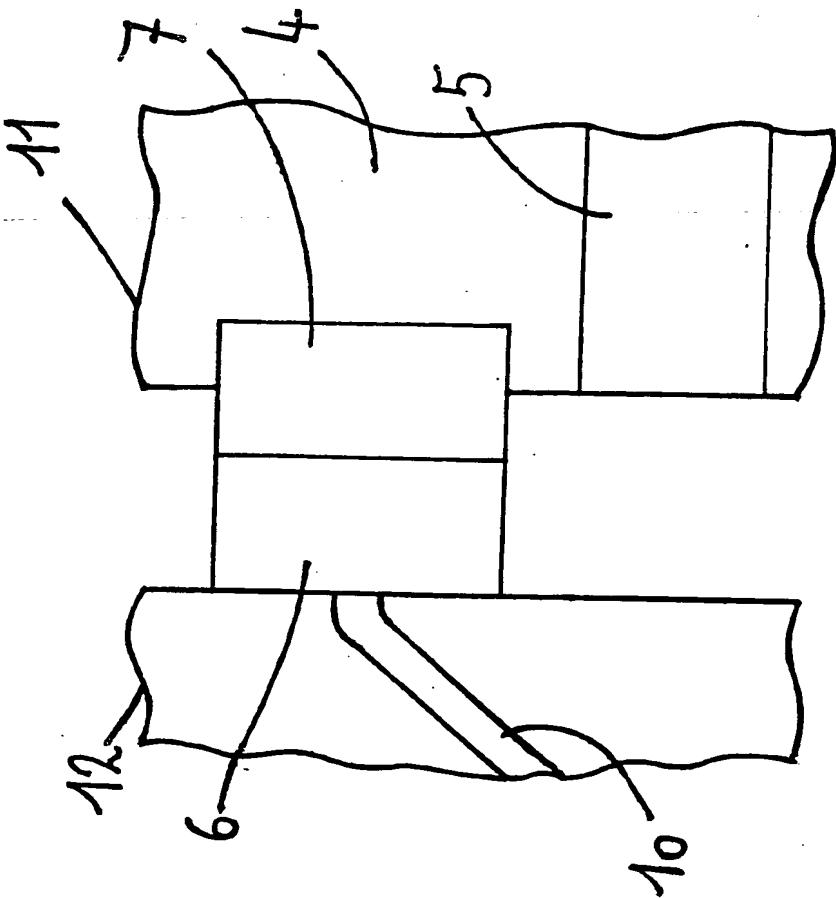


fig. 2

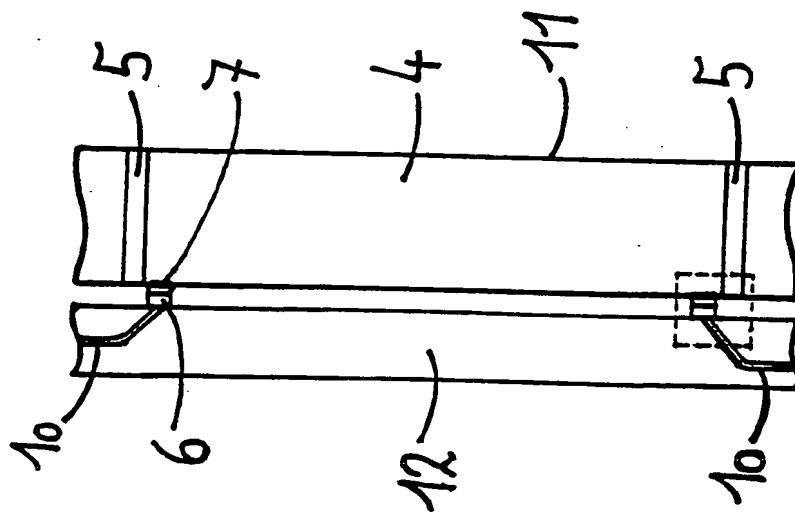


fig. 2